

**TESIS:** Efecto del tratamiento de los espermatozoides de verraco con ciclodextrinas saturadas de colesterol sobre la calidad del semen crioconservado con distintos crioprotectores

**AUTORA:** Eva Blanch Torres

## **RESUMEN**

Las inseminaciones artificiales en la especie porcina se realizan habitualmente con semen refrigerado, debido a las bajas tasas de fertilidad obtenidas con el semen congelado/descongelado. La membrana del espermatozoide sufre importantes daños cuando es sometida a la fase de enfriamiento desde la temperatura corporal hasta alcanzar los 5 °C (choque térmico), así como durante el proceso de congelación y descongelación. El aumento del contenido de colesterol en las membranas de los espermatozoides de cerdo podría mejorar su supervivencia tras la descongelación, como sucede en otras especies sensibles al choque térmico. Este incremento en la cantidad de colesterol se puede realizar fácilmente utilizando ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC). El tratamiento con CLC de espermatozoides de varias especies susceptibles al choque térmico antes de la congelación ha conseguido mejorar su supervivencia tras la descongelación. En los protocolos convencionales de congelación de semen porcino se utilizan habitualmente diluyentes de congelación compuestos por yema de huevo y glicerol, sin embargo, puede que estos diluyentes de congelación convencionales no sean los más apropiados para congelar espermatozoides tratados con CLC.

El objetivo de esta Tesis es evaluar la supervivencia a la congelación de los espermatozoides porcinos tratados con CLC o ciclodextrinas utilizando diluyentes de congelación convencionales, utilizando concentraciones alternativas tanto de yema de huevo como de glicerol o utilizando amidas en lugar de glicerol como crioprotectores

Utilizando medios convencionales, el tratamiento con 1mg de CLC o de metil- $\beta$ -ciclodextrina/120 millones de espermatozoides previamente a la congelación proporcionó una leve mejora de la integridad de la membrana plasmática espermática (+ 8%;  $P < 0,05$ ) y ningún beneficio sobre la movilidad

espermática ( $P > 0.05$ ). Además, la respuesta al tratamiento con CLC fue similar independientemente de si los espermatozoides procedían de verracos buenos o malos congeladores ( $P > 0.05$ ).

Una reducción de la concentración de yema de huevo de un 20 a un 10% fue perjudicial para la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación, incluidos aquellos que habían sido tratados previamente con CLC (- 12% espermatozoides vivos;  $P < 0.05$ ). Por otro lado, observamos que las concentraciones de glicerol utilizadas habitualmente (3%) no son las más apropiadas para congelar espermatozoides tratados con CLC (- 13% viabilidad espermática comparando con muestras control;  $P < 0.05$ ), ya que éstos mostraron una mayor tolerancia (+ 13 % espermatozoides vivos;  $P < 0.05$ ) que las muestras control a las concentraciones de glicerol más altas (5%).

Con respecto a la eficacia de las amidas como crioprotectores utilizados para congelar semen porcino, tres de las amidas (lactamida, acetamida y formamida) produjeron efectos perjudiciales durante su incubación con semen fresco ( $P < 0.05$ ). El resto de amidas evaluadas (metilformamida, dimetilacetamida y dimetilformamida) mejoraron eficientemente la viabilidad espermática tras la congelación (+ 5-15 %;  $P < 0.05$ ), sin embargo, afectaron negativamente tanto la movilidad espermática (- 11-16% móviles totales;  $P < 0.05$ ) como a la capacidad de fecundación in vitro (dimetilformamida: - 64 % en la tasa de penetración;  $P < 0.05$ ), independientemente de si el semen fue tratado con CLC o no. Por otro lado, las muestras tratadas con CLC mostraron mejor capacidad de fecundación in vitro que las muestras control cuando se utilizó el glicerol como crioprotector (+ 2 espermatozoides penetrados/ovocito;  $P < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que sería necesaria la adecuación de los protocolos de congelación convencionales para congelar semen porcino tratado con CLC con el propósito de alcanzar los claros beneficios obtenidos con dicho tratamiento cuando ha sido evaluado en otras especies sensibles al choque térmico.

**THESIS:** Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins or cyclodextrins prior to cryopreservation: effects on post-thaw in vitro sperm quality of sperm cryopreserved in different freezing extenders

**AUTHOR:** Eva Blanch Torres

## **ABSTRACT**

Cryopreserved boar sperm is not used extensively for artificial insemination due to poor fertility rates of the sperm after freezing and thawing. The sperm membrane is damaged when cooled from body temperature to 5 °C (cold shock), as well as during the freeze-thaw process. Increasing the cholesterol content of boar sperm membranes could increase their post-thaw survival, similarly to other species that are cold shock sensitive. Cholesterol can be easily added to sperm membranes using cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC). Treating sperm from different species susceptible to cold-shock with CLC before cryopreservation improves sperm cryosurvival. Egg yolk and glycerol are common constituents of extenders used for boar sperm cryopreservation. However, conventional freezing extenders could not be the appropriate for CLC-treated sperm.

The aim of this Thesis is to evaluate cryosurvival of CLC or cyclodextrin-treated boar sperm in three different conditions: using conventional freezing extenders, using extenders with alternative concentrations of glycerol and egg yolk and using amides as cryoprotectants.

CLC or methyl-  $\beta$ -cyclodextrin treatment (1 mg/  $120 \times 10^6$  sperm) prior to cryopreservation using a conventional freezer extenders provided either slight or no benefit, respectively, to post-thaw sperm plasma membrane integrity (+ 8%;  $P < 0.05$ ) and motility ( $P > 0.05$ ). In addition, sperm from both, good and poor freezers, responded similarly to CLC treatment ( $P > 0.05$ ).

Reduction in egg yolk concentration from 20 to 10% was detrimental for post-thaw sperm viability, even in semen treated with CLC (- 12% sperm viability;  $P < 0.05$ ). On the other hand, it was observed that traditional concentration of glycerol (3%) was not the appropriate to freeze CLC-treated sperm (- 13%

sperm viability compared to control;  $P < 0.05$ ). Thus, CLC-treated sperm showed a higher tolerance (+ 13 % sperm viability;  $P < 0.05$ ) to high glycerol concentrations (5%) than non-treated sperm.

Regarding the efficacy of amides as cryoprotectants, three of the amides (lactamide, acetamide and formamide) produced deleterious effects in fresh boar sperm ( $P < 0.05$ ). The other amides (methylformamide, dimethylacetamide and dimethylformamide) efficiently improved post-thaw sperm viability (+ 5-15 %;  $P < 0.05$ ) but negatively affected the sperm motility (- 11-16% total motile sperm;  $P < 0.05$ ) and the sperm fertilizing ability in vitro (dimethylformamide: - 64 % penetration rate;  $P < 0.05$ ), irrespective of the sperm treatment. On the other hand, CLC-treated samples showed better in vitro fertilizing ability than control samples when glycerol was used as cryoprotectant (+ 2 penetrated spermatozoa/oocyte;  $P < 0.05$ ).

The results obtained in this Thesis suggest that conventional freezing protocols should be optimized for CLC-treated boar sperm in order to obtain the benefit of CLC treatment observed in other species sensitive to cold shock.